

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition 09 novembre 2000 (09.11.00)	
Demande internationale no: PCT/FR00/01109	Référence du dossier du déposant ou du mandataire: BCT000031
Date du dépôt international: 26 avril 2000 (26.04.00)	Date de priorité: 30 avril 1999 (30.04.99)
Déposant: CABOCHE, Jean-Jacques etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:
09 mai 2000 (09.05.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

BEST AVAILABLE COPY

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: J. Zahra no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 30 JUL 2001

WIPO PCT



Référence du dossier du déposant ou du mandataire BCT000031/CN/EBR/SG	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01109	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26/04/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 30/04/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C08B30/12		
Déposant ROQUETTE FRERES		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 09/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 26.07.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Gerber, M N° de téléphone +49 89 2399 8528 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01109

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-24 version initiale

Revendications, N°:

1-9 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01109

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-9
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-9
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-9
	Non : Revendications	

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: FR-A-2 499 588 (KABUSHIKI KAISHA. HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 13 février 1982

D2: CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 11, 13 septembre 1999 Columbus, Ohio, US; abstract no. 143650, KURIKI TAKASHI ET AL.: 'Application of cluster dextrin as food ingredient.' XP002127630 & NIPPON SHOKUHN SHINSOZAI KENKYUKAISHI, vol. 1, no. 1, 1998, pages 15-22, jp

1. Nouveauté

L'objet des **revendications 1-9** n'est nouveau par rapport à D1 et D2 (Article 33(2) PCT).

Le document **D1**, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit un procédé d'**obtention d'un polymère de glucose branché par réaction d'une substance amyliacée avec une enzyme branchante**, par ramification d'un alpha-1,4-glucane en alpha-1,6 pour obtenir une structure similaire au glycogène ou à l'amylopectine, afin d'améliorer les qualités des produits alimentaires dans lesquels ils sont incorporés et notamment **empêcher la rétrogradation du produit amyliacé dans ces produits alimentaires**. L'enzyme branchante peut provenir de sources variées comme par exemple animal, plante ou microorganisme. Une **solution de substance amyliacée** telle qu'amidon, amylose ou amylopectine, **préparée par gélification et dispersion**, est ainsi **soumise à l'action de l'enzyme branchante**, puis est mélangée sans autre traitement, ou si nécessaire après concentration et séchage, avec les produits alimentaires souhaités.

D2 décrit un agglomérat de dextrine obtenu par **dégradation de l'amylopectine à l'aide d'une enzyme branchante** utilisé dans l'industrie alimentaire. Cet agglomérat de dextrine se caractérise par une distribution moléculaire en poids très étroite, une masse moléculaire élevée, une solubilité élevée dans l'eau, **une faible propension à**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

la **rétrogradation** et une absence de pouvoir réducteur.

Les documents D1 et D2 sont concernés par le même problème que la présente demande, à savoir la **suppression de la rétrogradation des substances amyliques dans les produits alimentaires**. Il apparaît clairement au vu de D1 et D2 que **c'est bien la teneur en liaisons glucosidiques alpha-1,6 qui empêche le polymère de glucose de rétrograder**. Les paramètres donnés dans la présente demande ne sont donc que descriptifs. En outre, les résultats présentés dans les exemples 1-4 de la présente demande ne font que confirmer les résultats de D1 et D2, à savoir l'intérêt d'utiliser des polymères de glucose branchés par rapport à d'autres dérivés amyliques. Les produits selon la présente demande et ceux de D1 sont issus de réactifs (enzyme débranchante et amidon) et de procédés identiques, et sont par conséquent identiques.

Il n'est pas possible de distinguer les polymères de glucose branchés de la présente demande de ceux de D1 et D2. En outre, la Demanderesse n'a pas fourni de preuve susceptible d'étayer une telle différence.

La nouveauté de l'objet des **revendications 1-9** ne peut donc pas être reconnue (Directives III-4.7a et IV-7.5 PCT).

2. Activité inventive

L'objet des **revendications 1-9** n'étant pas considéré comme nouveau, une analyse de l'activité inventive n'est pas nécessaire (Article 33(3) PCT).

3. Application industrielle

L'objet des **revendications 1-9** est susceptible d'application industrielle (Article 34(4) a) i) PCT).

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

1. L'unité de viscosité utilisée dans la revendication 2 et dans la description, à la page 7, ligne 26, page 12, ligne 32, page 13, ligne 3, page 20, lignes 28 et 32, page 21, ligne

THIS PAGE BLANK (USPTO)

22, page 22, ligne 3, n'est pas exprimée en plus dans les unités visées à la règle 10.1/a) PCT, c'est-à-dire en mPa.s.

2. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents **D1** et **D2** et ne cite pas ces documents.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1. Les expressions telles que "de préférence" ou "en particulier" n'ont pas d'effet limitatif sur la portée des **revendications 5, 7 et 9**, la caractéristique technique suivant une telle expression est donc considérée comme entièrement facultative (Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT, III-4.6). Dans le cas où une protection particulière était recherchée pour le mode de réalisation préféré ainsi visé, elle devrait être insérée dans une nouvelle revendication dépendante au moment de l'entrée dans la phase régionale.

2. L'utilisation du terme "substantiellement" rend les revendications 1 et 5 vise à élargir l'étendue de la protection recherchée de façon vague et non précisément définie. Il n'est en effet pas possible sur la seule base de ce terme de définir le domaine de valeurs se rapportant aux liaisons β glucosidiques du polymère selon la présente demande.

3. Les caractéristiques des **revendications 3 et 4** ne sont pas mentionnées dans la description.

Dans la **revendication 5**, le taux de matière sèche compris entre 1 et 50% en poids n'a pas de support dans la description (voir page 13, ligne 31, où le domaine de valeurs est compris entre 2 et 50% en poids).

La possibilité d'utiliser les enzymes de la **revendication 6** en **mélange** n'est pas mentionnée dans la description, à la page 15, lignes 3-5.

Les **revendications 3-6** ne se fondent donc pas sur la description, comme l'exige

THIS PAGE BLANK (USPTO)

l'article 6 PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

NARGOWALLA, Cyra
CABINET PLASSERAUD
84, rue d'Amsterdam
75440 Paris Cedex 09
FRANCE

REÇU LE

30. JUIL 2001

Cbt Plasseraud

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 26.07.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
BCT000031/CN/EBR/SG

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/01 109

Date du dépôt international (jour/mois/année)
26/04/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
30/04/1999

Déposant
ROQUETTE FRERES

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0. Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Hardy Magliano, N

Tél. +49 89 2399-8151





THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BCT000031/CN/EBR/SG		POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01109	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26/04/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 30/04/1999	
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C08B30/12			
Déposant ROQUETTE FRERES			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 09/05/2000		Date d'achèvement du présent rapport 26.07.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé Gerber, M N° de téléphone +49 89 2399 8528 	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01109

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-24 version initiale

Revendications, N°:

1-9 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01109

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-9
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-9
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-9
	Non : Revendications	

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: FR-A-2 499 588 (KABUSHIKI KAISHA. HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 13 février 1982

D2: CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 11, 13 septembre 1999 Columbus, Ohio, US; abstract no. 143650, KURIKI TAKASHI ET AL.: 'Application of cluster dextrin as food ingredient.' XP002127630 & NIPPON SHOKUJIN SHINSOZAI KENKYUKAISHI, vol. 1, no. 1, 1998, pages 15-22, jp

1. Nouveauté

L'objet des **revendications 1-9** n'est nouveau par rapport à D1 et D2 (Article 33(2) PCT).

Le document **D1**, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit un procédé d'**obtention d'un polymère de glucose branché par réaction d'une substance amylacée avec une enzyme branchante**, par ramification d'un alpha-1,4-glucane en alpha-1,6 pour obtenir une structure similaire au glycogène ou à l'amylopectine, afin d'améliorer les qualités des produits alimentaires dans lesquels ils sont incorporés et notamment **empêcher la rétrogradation du produit amylacé dans ces produits alimentaires**. L'enzyme branchante peut provenir de sources variées comme par exemple animal, plante ou microorganisme. Une **solution de substance amylacée** telle qu'amidon, amylose ou amylopectine, **préparée par gélatinisation et dispersion**, est ainsi **soumise à l'action de l'enzyme branchante**, puis est mélangée sans autre traitement, ou si nécessaire après concentration et séchage, avec les produits alimentaires souhaités.

D2 décrit un agglomérat de dextrine obtenu par **dégradation de l'amylopectine à l'aide d'une enzyme branchante** utilisé dans l'industrie alimentaire. Cet agglomérat de dextrine se caractérise par une distribution moléculaire en poids très étroite, une masse moléculaire élevée, une solubilité élevée dans l'eau, **une faible propension à**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

la **rétrogradation** et une absence de pouvoir réducteur.

Les documents D1 et D2 sont concernés par le même problème que la présente demande, à savoir la **suppression de la rétrogradation des substances amylacées dans les produits alimentaires**. Il apparaît clairement au vu de D1 et D2 que **c'est bien la teneur en liaisons glucosidiques alpha-1,6 qui empêche le polymère de glucose de rétrograder**. Les paramètres donnés dans la présente demande ne sont donc que descriptifs. En outre, les résultats présentés dans les exemples 1-4 de la présente demande ne font que confirmer les résultats de D1 et D2, à savoir l'intérêt d'utiliser des polymères de glucose branchés par rapport à d'autres dérivés amylés.

Les produits selon la présente demande et ceux de D1 sont issus de réactifs (enzyme débranchante et amidon) et de procédés identiques, et sont par conséquent identiques.

Il n'est pas possible de distinguer les polymères de glucose branchés de la présente demande de ceux de D1 et D2. En outre, la Demanderesse n'a pas fourni de preuve susceptible d'étayer une telle différence.

La nouveauté de l'objet des **revendications 1-9** ne peut donc pas être reconnue (Directives III-4.7a et IV-7.5 PCT).

2. Activité inventive

L'objet des **revendications 1-9** n'étant pas considéré comme nouveau, une analyse de l'activité inventive n'est pas nécessaire (Article 33(3) PCT).

3. Application industrielle

L'objet des **revendications 1-9** est susceptible d'application industrielle (Article 34(4) a) i) PCT).

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

1. L'unité de viscosité utilisée dans la revendication 2 et dans la description, à la page 7, ligne 26, page 12, ligne 32, page 13, ligne 3, page 20, lignes 28 et 32, page 21, ligne

THIS PAGE BLANK (USPTO)

22, page 22, ligne 3, n'est pas exprimée en plus dans les unités visées à la règle 10.1/a) PCT, c'est-à-dire en mPa.s.

2. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents **D1 et D2** et ne cite pas ces documents.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1. Les expressions telles que "de préférence" ou "en particulier" n'ont pas d'effet limitatif sur la portée des **revendications 5, 7 et 9**, la caractéristique technique suivant une telle expression est donc considérée comme entièrement facultative (Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT, III-4.6). Dans le cas où une protection particulière était recherchée pour le mode de réalisation préféré ainsi visé, elle devrait être insérée dans une nouvelle revendication dépendante au moment de l'entrée dans la phase régionale.

2. L'utilisation du terme "substantiellement" rend les revendications 1 et 5 vise à élargir l'étendue de la protection recherchée de façon vague et non précisément définie. Il n'est en effet pas possible sur la seule base de ce terme de définir le domaine de valeurs se rapportant aux liaisons β glucosidiques du polymère selon la présente demande.

3. Les caractéristiques des **revendications 3 et 4** ne sont pas mentionnées dans la description.

Dans la **revendication 5**, le taux de matière sèche compris entre 1 et 50% en poids n'a pas de support dans la description (voir page 13, ligne 31, où le domaine de valeurs est compris entre 2 et 50% en poids).

La possibilité d'utiliser les enzymes de la **revendication 6** en **mélange** n'est pas mentionnée dans la description, à la page 15, lignes 3-5.

Les **revendications 3-6** ne se fondent donc pas sur la description, comme l'exige

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/01109

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

l'article 6 PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) BCT000031

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

POLYMERES SOLUBLES DE GLUCOSE BRANCHES ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION

Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

ROQUETTE FRERES
62136 LESTREM
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les Etats désignés

☒

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐

les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐

les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

CABOCHE Jean-Jacques
Rue du Pré
62131 DROUVIN LE MARAIS
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les Etats désignés

☐

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☒

les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐

les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous es/à été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒

mandataire

☐

représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

NARGOLWALLA Cyra
CABINET PLASSERAUD
84 Rue d'Amsterdam
75440 PARIS CEDEX 09
FRANCE

n° de téléphone

01.44.63.41.11

n° de télécopieur

01.42.80.01.59

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i> LOOTEN Philippe 66 allée de l'Artois 59130 LAMBERSAT FRANCE		Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE	
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i> PETITJEAN Carole 4, rue Lyderic 59520 MARQUETTE LEZ LILLE FRANCE		Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE	
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i> FLECHE Guy 15, rue Gambetta 59190 HAZEBROUCK FRANCE		Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE	
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i> COMINI Serge 42, rue du Beaupré 59253 LA GORGUE FRANCE		Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i>
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE	
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
<input checked="" type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

BACKER Daniel
330, rue Berthelotte
62350 SAINT VENANT
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTAT

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

Brevet régional

- ☒ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ République-Unie de Tanzanie, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ EA Brevet eurasiatique : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasiatique et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée).

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanie | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Arménie | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Autriche | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input checked="" type="checkbox"/> MA Maroc |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input checked="" type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbade | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarie | <input checked="" type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Bélarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Allemagne | <input checked="" type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Danemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominique | <input checked="" type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonie | <input checked="" type="checkbox"/> SE Suède |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Espagne | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finlande | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenade | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Géorgie | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambie | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatie | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hongrie | <input checked="" type="checkbox"/> TZ République-Unie de Tanzanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonésie | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israël | <input checked="" type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Inde | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Islande | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille:

- ☒ .DZ Algérie
- ☒ .AG Antigua, et Barbuda

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (La confirmation (y compris les taxes) doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cadre n° VI REVENDICATION DE PRIORITÉ		<input type="checkbox"/> D'indiquer les revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 30.04.99 30 avril 1999	99 05523	FRANCE		
(2)				
(3)				

☐ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : _____

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.biii). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE				
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie: le code à deux lettres peut être utilisé): ISA/EP		Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière):		
		Date (jour/mois/année)	Numéro	Pays (ou office régional)
		21.01.2000	FA 576085	FRANCE

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant : requête : 5 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 24 revendications : 3 abrégé : 1 dessins : partie de la description réservée au listage des séquences : Nombre total de feuilles : 33	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input checked="" type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé suivent 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : suit 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : copie du Rapport de Recherche
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe. Paris, le 26 avril 2000 NARGOLWALLA Cyra

Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : 3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale : 4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes): ISA/EP	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

FEUILLE DE CALCUL DES TAXES

Annexe de la requête

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Timbre à date de l'office récepteur

Référence du dossier du
déposant ou du mandataire BCT000031/CT/EBR/SG

Déposant
ROQUETTE FRERES

CALCUL DES TAXES PRESCRITES

1. TAXE DE TRANSMISSION 400 T

2. TAXE DE RECHERCHE 6.198,79 S

Recherche internationale à effectuer par

(Si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont
compétentes en ce qui concerne la demande internationale, inscrire le nom de celle
qui est choisie pour la recherche internationale.)

3. TAXE INTERNATIONALE

Taxe de base

La demande internationale contient 33 feuilles.

30 premières feuilles 2.682,86 b1

3 x 59,04 = 177,12 b2
feuilles suivantes montant additionnel

Additionner les montants portés dans les cadres

b1 et b2 et inscrire le total dans le cadre B 2.859,98 B

Taxes de désignation

La demande internationale contient 85 designations.

8 x 577,24 = 4.617,92 D
nombre de taxes de montant de la taxe de désignation

désignation dues (maximum 8)

Additionner les montants portés dans les cadres B et D, et
inscrire le total dans le cadre I

(Les déposants de certains États ont droit à une réduction de 75 % sur la taxe
internationale. Lorsque le déposant a (ou tous les déposants ont) droit à cette
réduction, la somme devant figurer sous I est égale à 25 % de la somme des
montants figurant sous B et D.)

7.477,90 I

4. TAXE AFFÉRENTE AU DOCUMENT DE PRIORITÉ (le cas échéant) P

5. TOTAL DES TAXES DUES

Additionner les montants portés dans les cadres

T, S, I et P, et inscrire le résultat dans le cadre TOTAL. 14.076,69

TOTAL

☐ Les taxes de désignation seront payées ultérieurement.

MODE DE PAIEMENT

☐ autorisation de débiter un compte
de dépôt (voir ci-dessous)

☒ chèque

☐ mandat postal

☐ traite bancaire

☐ espèces

☐ timbres fiscaux

☐ coupons

☐ autres (préciser):

AUTORISATION CONCERNANT UN COMPTE DE DÉPÔT (les offices récepteurs ne permettent pas tous l'utilisation de ce mode de paiement)

L'office récepteur/ ☐ est autorisé à débiter mon compte de dépôt du total des taxes indiqué ci-dessus.

☐ (cette case ne peut être cochée que si les conditions relatives aux comptes de dépôt établies par l'office
récepteur le permettent) est autorisé à débiter mon compte de dépôt de tout montant manquant – ou à le
créditer de tout excédent – dans le paiement du total des taxes indiqué ci-dessus.

☐ est autorisé à débiter mon compte de dépôt du montant de la taxe afférente à l'établissement du document
de priorité et à sa transmission au Bureau international de l'OMPI.

Numéro du compte de dépôt

Date (jour/mois/année)

Signature

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BCT000031	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01109	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26/04/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 30/04/1999
Déposant ROQUETTE FRERES		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01109

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C08B30/12 C12P19/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08B C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 499 588 A (KABUSHIKI KAISHA. HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 13 février 1982 (1982-02-13) page 2, ligne 20 -page 3, ligne 13 ---	1-7,9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 11, 13 septembre 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 143650, KURIKI TAKASHI ET AL.: "Application of cluster dextrin as food ingredient." XP002127630 abrégé & NIPPON SHOKUJIN SHINSOZAI KENKYUKAISHI, vol. 1, no. 1, 1998, pages 15-22, jp -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BCT000031	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01109	International filing date (<i>day/month/year</i>) 26 April 2000 (26.04.00)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 30 April 1999 (30.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08B 30/12		
Applicant ROQUETTE FRERES		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 May 2000 (09.05.00)	Date of completion of this report 26 July 2001 (26.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01109

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-24 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-9 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01109

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-2 499 588 (KABUSHIKI KAISHA. HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 13 February 1982

D2: CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 131, No. 11,
13 September 1999 Columbus, Ohio, US, Abstract
No. 143650, KURIKI TAKASHI ET AL: "Application
of cluster dextrin as food ingredient."
XP002127630 & NIPPON SHOKUJIN SHINSOZAI
KENKYUKAISHI, Vol. 1, No. 1, 1998, pages 15-22,
jp

1. Novelty

The subject matter of **Claims 1-9** is not novel over D1 and D2 (PCT Article 33(2)).

Document **D1**, which is considered to be the closest prior art, describes a method for **producing a branched glucose polymer by reacting an amylaceous substance with a branching enzyme**, by means of conversion of an alpha-1,4-glucan into alpha-1,6 by

THIS PAGE BLANK (USPTO)

branching in order to produce a structure similar to that of glycogen or an amylopectin and thereby to enhance the qualities of the food products into which they are incorporated and, in particular, to **prevent retrogradation of the amylaceous material in these food products**. The branching enzyme can come from a variety of sources such as, for example, animal, plant or microorganism sources. A **solution of an amylaceous substance**, such as starch, amylose or amylopectin, **prepared by gelatinisation and dispersion**, is thus **exposed to the branching enzyme**, and is then mixed with the desired food products, without first undergoing any other treatment or, if necessary, after concentration and drying.

D2 describes a dextrin cluster used in the food industry and produced by means of **amylopectin breakdown using a branching enzyme**. This dextrin cluster is characterised by a very narrow molecular weight distribution, high molecular weight, high solubility in water, **very low tendency to retrograde** and a lack of reducing power.

Documents D1 and D2 relate to the same problem as the present application, namely, that of **preventing retrogradation of amylaceous substances in food products**. In light of D1 and D2, it is clear that **it is indeed the level of alpha-1,6 glucoside bonds that prevents the glucose polymer from retrograding**. It follows that the parameters in the present application are merely descriptive. Furthermore, the results presented in Examples 1-4 of the present application merely confirm the results of D1 and D2, namely, the advantage of using branched glucose polymers in comparison with other amyl derivatives.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The substances as per the present application and those of D1 are produced using identical methods and reagents (debranching enzyme and starch) and are therefore identical.

The branched glucose polymers of the present application cannot be distinguished from those of D1 and D2. Moreover, the applicant has not provided any information that could substantiate such a difference.

It follows that the subject matter of **Claims 1-9** cannot be considered to be novel (the PCT Guidelines III-4.7a and IV-7.5).

2. **Inventive step**

Since the subject matter of **Claims 1-9** is not considered to be novel, it is not necessary to examine the inventiveness thereof (PCT Article 33(3)).

3. **Industrial applicability**

The subject matter of **Claims 1-9** is industrially applicable (PCT Article 34(4)(a)(i)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. The unit of viscosity used in Claim 2 and in the description (page 7, line 26; page 12, line 32; page 13, line 3; page 20, lines 28 and 32; page 21, line 22; page 22, line 3) is not additionally expressed in terms of the units stipulated by PCT Rule 10.1 (a) and (b), that is, in mPa.s.
2. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not indicate the relevant prior art disclosed in documents **D1** and **D2**, nor does it cite said documents.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The expressions such as "preferably" or "in particular" do not have a limiting effect on the scope of **Claims 5, 7 and 9** and, as a result, the technical feature following an expression of this kind is considered to be entirely optional (PCT International Preliminary Examination Guidelines, III-4.6). If specific protection were to be sought for the preferred embodiment claimed in this manner, it should be included in a new dependent claim when the application enters the regional phase.
2. The use of the term "substantially" in Claims 1 and 5 attempts to broaden the scope of protection sought in a manner which is vague and not clearly defined. Indeed, it is not possible on the basis of this term alone to define the range of values relating to the β glucoside bonds of the polymer as per the present application.
3. The features of **Claims 3 and 4** are not mentioned in the description.

In **Claim 5**, the dry matter content of between 1 and 50 % by weight is not supported by the description (see page 13, line 31 where the range of values is of between 2 and 50 % by weight).

The option of using the enzymes of **Claim 6** in a **mixture** is not mentioned in the description, page 15, lines 3-5.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01109

VIII. Certain observations on the international application

It follows that, contrary to the requirements of PCT Article 6, **Claims 3-6** are not supported by the description.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C08B 30/12, C12P 19/16	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/66633 (43) Date de publication internationale: 9 novembre 2000 (09.11.00)
--	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01109

(22) Date de dépôt international: 26 avril 2000 (26.04.00)

(30) Données relatives à la priorité:
99/05523 30 avril 1999 (30.04.99) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ROQUETTE
FRERES [FR/FR]; F-62136 Lestrem (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CABOCHE,
Jean-Jacques [FR/FR]; Rue du Pré, F-62131 Drou-
vin Le Marais (FR). LOOTEN, Philippe [FR/FR]; 66, allée
de l'Artois, F-59130 Lambersat (FR). PETITJEAN, Carole
[FR/FR]; 4, rue Lyderic, F-59520 Marquette Lez Lille
(FR). FLECHE, Guy [FR/FR]; 15, rue Gambetta, F-59190
Hazebrouck (FR). COMINI, Serge [FR/FR]; 42, rue du
Beaupré, F-59253 La Gorgue (FR). BACKER, Daniel
[FR/FR]; 330, rue Berthelotte, F-62350 Saint Venant (FR).(74) Mandataire: NARGOLWALLA, Cyra; Cabinet Plasseraud, 84,
rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: BRANCHED GLUCOSE SOLUBLE POLYMERS AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Titre: POLYMERES SOLUBLES DE GLUCOSE BRANCHES ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION

(57) Abstract

The invention relates to glucose soluble polymers which do not substantially contain any β glucosidic bonds, characterized in that they comprise 2.5 - 10 % α -1,6 glucoosidic bonds, have a very low or zero tendency to retrograde in an aqueous solution determined according to a test A, possess an MP which is determined according to a test C having a median value of the distribution profile of the molecular masses ranging from 10⁴ and 10⁵ Daltons and have a reducing sugar content that is at most 9 %.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet des polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons β glucosidiques, caractérisés par le fait qu'ils présentent entre 2,5 et 10 % de liaisons glucosidiques α -1,6, une tendance très faible ou nulle à la rétrogradation en solution aqueuse, déterminée selon un test A, un Mp déterminé selon un test C à une valeur centrée du profil de distribution des masses moléculaires compris entre 10⁴ et 10⁵ daltons et une teneur en sucres réducteurs au plus égale à 9%.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

**POLYMERES SOLUBLES DE GLUCOSE BRANCHES
ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION**

L'invention a pour objet des polymères solubles de
5 glucose branchés ne contenant substantiellement pas de
liaisons β glucosidiques, qui présentent des teneurs
particulières en liaisons glucosidiques α -1,6, une
excellente stabilité en solution exprimée par leur faible
tendance à la rétrogradation et une remarquable
10 distribution des poids moléculaires dans un intervalle
compris entre 10^4 et 10^8 daltons.

Ces polymères solubles de glucose branchés présentent
par ailleurs une faible teneur en sucres réducteurs et une
faible viscosité.

15 L'invention concerne également un procédé de
fabrication desdits polymères solubles de glucose branchés.
Elle vise encore des compositions comprenant de tels
polymères solubles de glucose branchés qu'il est possible
d'utiliser dans de nombreuses applications industrielles et
20 notamment dans les industries alimentaires.

Au sens de l'invention, les polymères solubles de
glucose branchés ne contenant substantiellement pas de
liaisons β glucosidiques sont des polymères de glucose lié
en α -1,4 et présentant de nombreux points de ramification
25 (encore appelés points de branchement) en α -1,6, et moins
de 5 % de branchement en β , c'est-à-dire en β -1,2, β -1,3,
 β -1,4 ou β -1,6.

Les polymères du glucose classiquement accessibles
industriellement sont notamment issus des amidons naturels
30 ou hybrides et de leurs dérivés.

Généralement, l'amidon est constitué de deux
polymères, l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est la

fraction renfermant des homopolymères linéaires de glucose liés en α -1,4 et quelques points de branchement en α -1,6. L'amylopectine est quant à elle la fraction ramifiée, constituée de chaînes linéaires de glucose en α -1,4 reliées
5 à d'autres chaînes linéaires de glucose en α -1,4 par des points de ramification en α -1,6.

L'association de ces deux homopolymères, empaquetés sous la forme de granules d'amidon très bien structurés, constitue la réserve de source carbonée de la plante.

10 L'amidon produit dans chaque plante est constitué d'un pourcentage variable en chacun de ses constituants amylose et amylopectine, voire même d'une distribution particulière des poids moléculaires de chacun desdits homopolymères de glucose. Ce qui explique la raison pour
15 laquelle les divers amidons et leurs dérivés sont habituellement classés en fonction de leur origine botanique.

Les propriétés fonctionnelles des amidons et de leurs dérivés sont en outre directement fonction de leur contenu
20 en amylose et amylopectine. Ainsi, lorsque l'on chauffe une suspension d'amidon au delà de la température de gélatinisation, le granule d'amidon gonfle, et l'amylose se solubilise préférentiellement. Cependant, lors du refroidissement de la suspension, les homopolymères de
25 glucose rétrogradent, rapidement pour l'amylose (quelques heures), et de manière plus lente pour l'amylopectine (quelques jours).

Or, les spécialistes du domaine de l'utilisation des amidons et des dérivés de l'amidon en industrie alimentaire
30 s'accordent à dire que ce phénomène de rétrogradation affecte la texture des aliments, et en diminue la durée de vie.

Il est connu de rendre plus acceptables ces produits, en les préparant à partir de produits amylacés riches en amylopectine, et donc par exemple à partir des variétés waxy. Cependant, la stabilité des gels et liants obtenus à partir desdits produits amylacés riches en amylopectine n'est pas suffisante pour les besoins des industries alimentaires, où il est parfois nécessaire d'avoir une durée de stockage de plusieurs mois.

Une première solution consiste à stabiliser les homopolymères de glucose, et ce grâce à des agents chimiques. Cette opération est la plupart du temps effectuée par la mise en oeuvre de réactions d'estérification ou d'éthérification. Il peut s'agir notamment de réactions d'acétylation ou d'hydroxypropylation. En outre, pour obtenir les propriétés de texture et de viscosité souhaitées, ces réactions sont souvent associées à une réaction de réticulation.

Ces modifications confèrent alors des propriétés rhéologiques remarquables aux amidons, les rendant plus résistants aux traitements mécaniques tels le cisaillement, ou aux milieux acides. L'acétylation ou l'hydroxypropylation confèrent en outre une bonne stabilité au stockage après cuisson, notamment à basse température.

Cependant, les produits ainsi obtenus présentent l'inconvénient d'avoir été traités chimiquement, ce qui est souvent mal perçu par les consommateurs.

Une seconde solution consiste à isoler l'amidon à partir de plantes dont certains gènes impliqués dans la biosynthèse de l'amidon ont été altérés, ce qui confère aux amidons ainsi modifiés des propriétés particulières.

Il peut s'agir de variétés mutantes ou hybrides, affectées au niveau des gènes waxy (wx), amylose extender

(ae), dull (du), opaque (o) shrunken (sh), brittle (bt), ou sugary (su).

Le brevet 4.767.849 décrit ainsi l'amidon extrait d'une variété de maïs homozygote pour le génotype
5 waxy/shrunken-1, qui confère aux amidons granulaires ainsi obtenus des propriétés de stabilité à la rétrogradation en cycles de congélation/décongélation (classiquement appelés cycles de gel/dégel) équivalents aux amidons modifiés chimiquement. Cependant, ces variétés obtenues par
10 croisement entre deux variétés de génotype waxy et shrunken ne présentent qu'une teneur en amidon comprise entre 1 et 20 % de la teneur en amidon normalement synthétisée par les variétés dites de type sauvage.

Il peut s'agir également de plantes génétiquement
15 modifiées, obtenues par modification ciblée d'un gène ou d'un ensemble de gènes codant pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon. Les stratégies d'extinction ou d'amplification génique dans la plante, des gènes codant par exemple pour les enzymes de débranchement
20 ou de branchement de l'amidon propres à la plante, ou d'origine exogène, tels les gènes de biosynthèse du glycogène des bactéries, ont été abondamment décrites.

Cependant, force est de constater, comme dans le cas des plantes mutantes ou hybrides, que si les amidons ainsi
25 modifiés présentent des propriétés équivalentes aux amidons modifiés chimiquement, les teneurs en amidon des plantes ainsi obtenues sont loin d'être industriellement satisfaisantes.

Une première alternative à ces procédés consiste à
30 utiliser des enzymes de type α -amylase, α -amylase, pullulanase, iso-amylase pour modifier *in vitro* les amidons natifs afin de leur conférer certaines des propriétés des

amidons modifiés chimiquement. Il n'y a donc normalement plus de problèmes liés aux quantités mises en œuvre.

La demande de brevet EP 539.910 décrit ainsi un procédé de préparation de granules d'amidon modifié par un traitement à l' α -amylase, pour obtenir des produits de moindre viscosité. Cependant, ce procédé ne vise qu'à altérer la structure du granule d'amidon, sans en modifier profondément les constituants.

Le brevet EP 574.721 décrit la préparation d'un produit amylicé à haute teneur en amylopectine stable, en n'utilisant pas de traitement chimique proprement dit, mais en effectuant une réaction d'hydrolyse contrôlée à la β -amylase sur un amidon granulaire natif.

Le produit ainsi préparé présente alors une absence de synérèse et de modification de viscosité dans le temps, et est stable au gel/dégel. Cependant, ce procédé nécessite une étape de traitement thermique préalable, à une température comprise entre 65 et 75°C, pour gélatiniser l'amidon avant de réaliser l'hydrolyse enzymatique proprement dite. De plus, il est surtout nécessaire de contrôler le taux d'hydrolyse pour le limiter à une valeur comprise entre 5 et 20 %.

Une autre alternative aux procédés visant à modifier chimiquement les amidons natifs, ou à extraire des amidons natifs possédant des propriétés d'amidons modifiés à partir de plantes mutantes, hybrides ou génétiquement modifiées, consiste à introduire *in vitro* de nouveaux points de branchement dans l'amidon.

Il s'agit alors de conduire un remaniement des chaînes d'amylopectine ou d'amylose, plutôt que de mettre en œuvre des réactions de stabilisation et/ou de réticulation comme indiqué précédemment.

Deux techniques sont habituellement mises en oeuvre. La première utilise des moyens thermiques, la seconde des enzymes purifiées de biosynthèse du glycogène et/ou de l'amidon, telles les enzymes de branchement du glycogène ou de l'amidon, responsables respectivement de la synthèse des points de ramification en α -1,6 du glycogène, ou des points de ramification en α -1,6 de l'amylopectine et des quelques points de branchement de l'amylose.

La demande de brevet WO 95/22562 décrit par exemple des dextrans de type amidon, caractérisées par leur poids moléculaire compris entre $15 \cdot 10^3$ et 10^7 daltons, et un degré de branchement compris entre 2 et 8 %, obtenues par le traitement, en conditions acides (acide orthophosphorique à 0,17 % en poids d'amidon) et à une température comprise entre 110 à 140°C pendant de 1 à 15 h, d'amidon granulaire natif, notamment de la fécule de pomme de terre.

La composition ainsi obtenue est destinée aux sportifs comme apport énergétique après un effort physique. Cependant, ce traitement est long et très lourd à mettre en oeuvre, et il conduit à des polymères de glucose qui renferment, outre une teneur élevée en liaisons α -1,6 (de préférence comprise entre 3 et 7 %), de nouveaux types de liaisons qui n'existent pas normalement dans l'amidon natif. Les analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) révèlent en effet des liaisons de type β -1,4, β -1,6, et des liaisons α autres qu'en α -1,4 et en α -1,6.

De tout ce qui précède, il résulte qu'il y a donc un besoin non satisfait de disposer, d'une part, de polymères de glucose présentant des propriétés remarquables, notamment en terme de stabilité, de solubilité et éventuellement de viscosité et conférant par la même aux

produits qui les contiennent des capacités plus grandes de durées de vie et de digestibilité, et d'autre part, de les obtenir sans utiliser de techniques chimiques ou physiques, ni d'avoir recours à des extractions à partir de plantes
5 mutantes ou génétiquement modifiées.

La société Demanderesse a eu le mérite de concilier tous ces objectifs réputés jusqu'alors difficilement conciliables en imaginant et élaborant, au prix de nombreuses recherches, de nouveaux types de produits à
10 savoir de nouveaux polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons β glucosidiques.

Les polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons β glucosidiques conformes à l'invention sont ainsi caractérisés par le fait
15 qu'ils possèdent entre 2,5 et 10 % de liaisons glucosidiques α -1,6, une tendance très faible ou nulle à la rétrogradation en solution aqueuse, déterminée selon un test A et un Mp déterminé selon un test C à une valeur
20 centrée du profil de distribution des masses moléculaires comprise entre 10^4 et 10^8 daltons.

Les polymères de glucose branchés conformes à l'invention présentent par ailleurs une faible teneur en sucres réducteurs, au plus égale à 9 % et une viscosité
25 déterminée selon un test B, pour 3 g de produit sec, au plus égale à 5.000 cP.

La teneur en liaisons glucosidiques α -1,6 des polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention, déterminée par analyse RMN du proton, est de
30 2,5 à 10 %, exprimée en nombre de liaisons α -1,6 par rapport au nombre total de liaisons glucosidiques α -1,4 et α -1,6 des dits polymères de glucose branchés.

Cette teneur en liaisons glucosidiques α -1,6, confère à tout polymère de glucose conforme à l'invention une structure particulière, en termes de degré de ramification et/ou de longueurs de chaînes ramifiées en regard de l'amidon ou du dérivé d'amidon dont il est issu.

Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent également une faible tendance à la rétrogradation en solution aqueuse, déterminée selon un test A. Ce test consiste à établir l'aptitude à la rétrogradation d'un produit donné au cours de cycles répétés de gel/dégel.

La rétrogradation observée du produit, et l'enthalpie de déstructuration du produit qui a pu rétrograder, déterminée par Analyse Calorimétrique Différentielle, renseignent donc sur la stabilité du produit considéré.

Le test A consiste plus précisément à effectuer une préparation aqueuse du produit à tester à 40 % de matière sèche. On effectue différents prélèvements dans des creusets hermétiquement clos. L'ensemble des creusets est porté pendant 15 min à une température de 100°C pour réaliser la gélatinisation ou la mise en solution, et on soumet ensuite ces creusets à un traitement de cycles de gel/dégel, chacun des cycles consistant à amener et maintenir ladite préparation pendant 15 min à une température de -20°C, puis à une température de 20°C et à la maintenir ensuite pendant 1 h 30 à cette température.

Une analyse calorimétrique différentielle est ensuite réalisée à chaque cycle, sur équipement PERKIN ELMER, pour la détermination de l'enthalpie de déstructuration du produit qui a pu alors rétrograder.

La stabilité aux cycles de gel/dégel s'apprécie donc en premier lieu par le nombre de cycle de gel/dégel au delà duquel on peut réaliser cette mesure de la valeur

d'enthalpie requise pour déstructurer le gel d'amidon qui a alors rétrogradé.

Les polymères de glucose conformes à l'invention soumis à ces cycles répétés de gel/dégel présentent, de manière surprenante et inattendue, une « faible tendance à la rétrogradation », c'est-à-dire ici une absence partielle, voire totale de rétrogradation selon le test A et en fonction de leur teneur en liaisons glucosidiques α -1,6.

C'est ainsi que les polymères de glucose conformes à l'invention qui présentent une teneur en liaisons glucosidiques α -1,6 comprise entre 2,5 et 5 %, ne commencent à rétrograder significativement qu'au delà du huitième cycle de gel/dégel, en présentant une faible valeur d'enthalpie de rétrogradation, comme il sera exemplifié ci-après.

On les qualifie de polymères de glucose branchés présentant une « très faible tendance à la rétrogradation ».

Quant aux polymères de glucose conformes à l'invention qui présentent une teneur en liaisons glucosidiques α -1,6 comprise entre 5 et 10 %, aucune rétrogradation de la solution n'est constatée même après 12 cycles de gel/dégel, ce qui explique pourquoi aucune enthalpie de déstructuration ne peut être établie.

Il est particulièrement surprenant que les polymères de glucose conformes à l'invention, puissent présenter une telle stabilité. En effet, les mesures effectuées avec le test A, sur les amidons waxy et les amidons waxy réticulés et acétylés, (tels ceux préparés en suivant les enseignements du brevet US 2.928.828) rétrogradent entre le quatrième et le sixième cycle de gel/dégel, comme il sera montré dans l'exemple 2.

Il n'existe donc pas, à la connaissance de la société Demanderesse, de polymères de glucose qui présentent une telle stabilité.

Cette propriété destine tout naturellement les
5 polymères de glucose branchés conformes à l'invention à des compositions utilisables en industrie alimentaire, qui présentent alors des stabilités élevées au stockage.

Un autre avantage de l'invention est de permettre l'obtention d'un produit fini, utilisable par exemple comme
10 liant instantané dans des produits réfrigérés ou surgelés.

la détermination de la valeur centrée du profil de distribution des masses moléculaires des polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention est réalisée par la mesure de la distribution des masses moléculaires
15 moyennes en poids (M_p).

Dans la pratique les valeurs de M_p ne se calculent pas, mais se mesurent par différentes techniques. On utilise par exemple une méthode de mesure adaptée aux polymères de glucose, qui repose sur la chromatographie de perméation de gel sur des colonnes de chromatographie
20 étalonnées avec des pullulans de masses moléculaires connues.

Le test C, mis au point par la société Demanderesse pour déterminer la valeur centrée du profil de distribution des masses moléculaires caractéristiques des polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention, consiste :

- à établir le profil de distribution molaire des fractions chromatographiques desdits polymères solubles de glucose branchés,
30
- à déterminer la valeur dite « valeur centrée du profil de distribution des masses moléculaires » qui correspond à la valeur du pic moyen de

distribution des poids moléculaires de la population représentant plus de 90% des fractions chromatographiques issues de ladite chromatographie séparative de perméation de gel.

5 Les polymères de glucose branchés conformes à l'invention présentent alors une valeur M_p centrée du profil de distribution de masses moléculaires comprise entre 10^4 et 10^9 daltons.

De manière avantageuse, les polymères solubles de
10 glucose conformes à l'invention peuvent être classés en deux familles, la première famille présentant une valeur de M_p centrée du profil de distribution de masses moléculaires comprise entre 10^5 et 10^6 daltons, et la seconde famille présente une valeur de M_p centrée du profil de distribution
15 de masses moléculaires compris entre 10^7 et 10^8 daltons.

Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention présentent par ailleurs une faible teneur en sucres réducteurs.

La détermination du pouvoir réducteur des polymères
20 de glucose branchés conformes à l'invention, par toute méthode connue par ailleurs de l'homme du métier, conduit à des valeurs au plus égale à 9 %.

De manière avantageuse, les polymères de glucose branchées peuvent être classés en deux sous-familles en
25 fonction de leur teneur en sucres réducteurs.

La première sous-famille présente une teneur en sucres réducteurs au plus égale à 1 %.

La seconde sous-famille présente une teneur en sucres réducteurs comprise entre 5,5 et au plus 9 %.

30 La société Demanderesse a en outre trouvé que les polymères de glucose branchés conformes à l'invention présentent des profils rhéologiques tout à fait particuliers.

L'analyse de viscosité des polymères de glucose branchés conformes à l'invention est réalisée grâce à un test B mis au point par la société Demanderesse pour cette gamme particulière de produits.

5 Il ne s'agit pas en effet ici de produits granulaires tels qu'habituellement décrits et analysés dans l'état de la technique, mais de polymères de glucose branchés qui présentent de manière surprenante et inattendue une remarquable solubilité dans l'eau froide.

10 Le test B consiste à préparer tout d'abord le produit à analyser par précipitation à l'éthanol, séchage sous vide puis broyage au mortier, et enfin tamisage sur tamis de maille 125 μ m. Une masse comprise entre 3 et 15 g du produit sec à analyser ainsi obtenu est alors introduite,
15 avec 6,75 g de glycérol à 98 % de pureté, dans le bol d'un Rapid Visco Analyser (RVA - Newport Scientific), et l'ensemble est soigneusement homogénéisé à l'aide d'une micro-spatule.

Une quantité d'eau déminéralisée est ensuite ajoutée,
20 afin d'obtenir une masse finale de 28 g. L'ensemble est alors immédiatement agité. Le profil d'analyse temps / température et vitesse dans le RVA est alors réalisé comme suit. L'échantillon est agité à 100 rpm à une température de 25°C durant 5 s, puis à 500 rpm pendant 25 s.
25 L'agitation est alors maintenue à 160 rpm durant le reste du profil. La température initiale de 25°C est maintenue durant 10 min, puis elle est augmentée à 90°C en 8 min. Cette température de 90°C est ensuite maintenue 3 min, diminuée à 30°C en 8 min, puis maintenue à cette valeur de
30 30°C durant 5 min.

La viscosité retenue est la viscosité mesurée en centipoises (cP) en fin de profil d'analyse, à 34 min.

Les polymères de glucose branchés conformes à l'invention présentent alors une viscosité au plus égale à 5.000 cP pour 3 g sec de produit.

La société Demanderesse a également trouvé que ces
5 valeurs de viscosité des polymères de glucose branchés conformes à l'invention sont du même ordre de grandeur que les valeurs de viscosité, déterminées en suivant le même test B, des amidons waxy fluidifiés par traitement acide.

Cependant, des analyses complémentaires de mesure de
10 viscosité effectuées après sept jours de stockage à 4°C, ont permis de mettre en évidence, de manière surprenante et inattendue, une remarquable stabilité de la viscosité des polymères de glucose branchés, contrairement auxdits amidons waxy fluidifiés de même viscosité, comme il sera
15 exemplifié ci-après.

Ces produits peuvent donc être par exemple
avantageusement utilisés pour la fabrication de
préparations alimentaires liquides instantanées, et surtout
peuvent permettre d'assurer le stockage de longue durée à
20 basse température.

Les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention sont donc particulièrement bien adaptés à des compositions destinées à être utilisées dans les industries notamment du Papier-Carton, du Textile, de la Pharmacie, de
25 la Cosmétique, et ainsi en particulier de l'Alimentaire.

Pour préparer les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention, on réalise la succession des étapes suivantes qui consiste en ce que l'on :

a) soumet une suspension aqueuse d'amidon ou de dérivé
30 d'amidon d'une matière sèche au moins égale à 1 % en poids, de préférence de 2 à 50 % en poids, à une température supérieure à 130°C, de préférence comprise entre 140 et 150°C, sous une pression de plus de 3,5

bars, de préférence comprise entre 4 à 5 bars pendant au moins 2 minutes, de préférence pendant 2 à 5 minutes,

b) traite l'amidon ainsi obtenu avec 50 à 2.000 unités d'enzyme de branchement purifiée à une température comprise entre 25 et 50°C, de préférence à une température de 30°C pendant une durée de 10 min à 24 heures,

c) recueille les polymères de glucose branchés ainsi obtenus.

L'amidon est introduit en solution aqueuse à une matière sèche au moins égale à 1 % en poids, de préférence de 2 à 50 % en poids.

Le choix d'une origine, ou d'une qualité d'amidon ou de ses dérivés particuliers, ne revêt qu'une importance relative.

La société Demanderesse a trouvé que les polymères de glucose branchés conformes à l'invention sont aisément synthétisables à partir d'amidons ou de leurs dérivés, qui présentent déjà un taux de branchement au moins égal à 1 %.

Cette suspension d'amidon ou de dérivés d'amidon est soumise ensuite à un traitement par cuisson particulier, qui consiste à la traiter à une température supérieure à 130°C, de préférence comprise entre 140 et 150°C, sous une pression de plus de 3,5 bars, de préférence comprise entre 4 à 5 bars pendant au moins 2 minutes, de préférence pendant 2 à 5 minutes. Ce traitement est réalisé avantageusement dans un cuiseur tubulaire à double enveloppe chauffé par fluide thermique, équipement qu'il est aisé à l'homme du métier de se procurer.

La deuxième étape du procédé conforme à l'invention consiste à traiter l'amidon ainsi obtenu avec de 50 à 2.000 unités d'enzyme de branchement purifiée à une température

comprise entre 25 et 50°C, de préférence à une température de 30°C pendant une durée de 10 min à 24 heures.

Les enzymes de branchement sont choisies dans le groupe constitué des enzymes de branchement du glycogène et des enzymes de branchement de l'amidon. Plus
5 préférentiellement, on choisit l'enzyme de branchement du glycogène de *Escherichia coli*, et les enzymes de branchement de l'amidon, et plus préférentiellement encore les enzymes de branchement de l'amidon de type I et de type
10 II du maïs, ou encore de l'amidon d'algue unicellulaire, par exemple celles de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'isolement des dites enzymes de branchement du glycogène ou de l'amidon peut être effectué par tout moyen
15 connu en soi par l'homme du métier.

Concernant les enzymes de branchement d'algue unicellulaire, la société Demanderesse recommande cependant de mettre en oeuvre le procédé de préparation décrit dans la demande de brevet français déposée sous le n° 98/12051,
20 dont elle est titulaire.

L'accès aux enzymes purifiées peut être réalisé à partir du mélange d'enzymes d'algue ainsi obtenu, en mettant en oeuvre directement des techniques de séparation chromatographique en elles-mêmes connues, ou par
25 l'utilisation des techniques de l'ADN recombinant.

Il peut être en effet avantageux de préférer isoler et exprimer les gènes codant pour les enzymes de branchement de l'amidon d'algue unicellulaire dans un micro-organisme plus facilement manipulable que les algues
30 unicellulaires.

La technique, connue en soi par l'homme du métier, consiste alors par exemple à :

- produire des anticorps polyclonaux spécifiques de chacune des enzymes de branchement de l'amidon d'algue préalablement purifiée,
- cribler, avec lesdits anticorps spécifiques, une banque d'expression d'ADN génomique de l'algue unicellulaire considérée,
- isoler les fragments d'ADN à partir des clones de ladite banque d'expression d'ADN génomique qui ont réagi avec l'un et/ou l'autre des anticorps polyclonaux spécifiques,
- introduire lesdits fragments d'ADN correspondants aux gènes codant pour les enzymes de branchement de l'amidon d'algue unicellulaire dans des bactéries permettant leur expression.

Les enzymes de branchement de l'amidon d'algue produites par ce procédé sont dites des enzymes de branchement recombinantes, puisque en provenance d'une algue unicellulaire, puis transférées génétiquement et exprimées dans un micro-organisme d'une autre espèce, en l'occurrence ici une bactérie.

Pour préparer les polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention, on peut donc faire agir avantageusement une enzyme de branchement de l'amidon d'algue purifiée recombinante sur une colle d'amidon de maïs waxy préparé selon l'étape a) dudit procédé.

La dernière étape du procédé conforme à l'invention consiste donc à collecter les polymères de glucose branchés ainsi obtenus.

Les produits sont précipités par 3 volumes d'éthanol, purifiés et séchés sous vide pendant 24 heures, ou encore atomisés, par toute technique connue par ailleurs de l'homme du métier.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples non limitatifs décrits ci-dessous

5 **EXEMPLE 1**

La préparation des polymères de glucose branchés s'effectue comme suit. On prépare une suspension d'amidon de maïs waxy d'une teneur en matière sèche de 2,5 % en poids. On traite ensuite cette suspension dans un cuiseur
10 tubulaire à double enveloppe chauffé par fluide thermique de laboratoire, à une température de 145°C, sous une pression de 4 bars. Le débit d'alimentation est de 40 ml/min, pour un temps de séjour dans ledit cuiseur de 3 minutes.

15 1,5 litres de cette préparation sont refroidis à température ambiante et placés dans un milieu tamponné à pH 7 par du tampon Tris HCl 0,1 M final pour un volume total de 3,750 litres. On ajoute 19 ml (d'une solution enzymatique à 1,8 mg/ml de protéines, présentant en outre
20 une activité spécifique de 1.100 U/mg, activité mesurée par la méthode de dosage à la phosphorylase A connue en soi par l'homme du métier) d'une solution d'enzymes de branchement de l'amidon recombinantes de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* préalablement purifiées, et on laisse agir à
25 30°C pendant 30 min pour obtenir des polymères de glucose branchés conformes à l'invention présentant une teneur en liaisons glucosidiques α -1,6 de 4,3 % (produit A), et pendant 2 heures, pour obtenir des polymères de glucose branchés, conformes à l'invention, présentant une teneur en
30 liaisons glucosidiques α -1,6 de 6 % (produit B). Chacun des produits est ensuite précipité à l'éthanol, filtré, rincé et séché sous vide pendant 24 heures.

Les valeurs respectives des M_p centrées du profil de distribution des masses moléculaires des produits A et B sont respectivement de $1,5 \cdot 10^7$ daltons et de $2,2 \cdot 10^7$ daltons. Leurs teneurs en sucres réducteurs est
5 respectivement de 0,05 % et de 0,07 %.

EXEMPLE 2

La détermination de la stabilité des polymères de glucose branchés conformes à l'invention est réalisée par
10 la mesure de l'enthalpie de déstructuration du produit rétrogradé, si produit rétrogradé il y a, par Analyse Calorimétrique Différentielle, au cours de cycles répétés de gel/dégel.

Deux polymères de glucose branchés conformes à
15 l'invention, présentant respectivement une teneur en liaisons glucosidiques α -1,6 de l'ordre de 4,3 % (produit A) et de l'ordre de 6 % (produit B) sont préparés comme indiqué dans l'exemple 1. L'analyse est également effectuée sur deux autres échantillons : de l'amidon de maïs waxy
20 (produit C) et un amidon waxy réticulé et acétylé, présentant un indice d'acétyle de 1,8 (produit D).

Comme indiqué dans le test A, on constitue une préparation aqueuse de chacun des 4 échantillons à 40 % de matière sèche placés dans un ensemble de creusets
25 hermétiquement clos, et on chauffe pendant 15 min à 100°C dans un four DSC4 de PERKIN ELMER. On réalise pour chaque creuset de 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 cycles successifs de gel/dégel en suivant le protocole suivant : 15 min à -22°C, puis 1h30 à 20°C. Une mesure de l'enthalpie de
30 rétrogradation est effectuée sur chaque creuset en le plaçant dans le calorimètre différentiel PERKIN ELMER.

Le tableau I suivant présente les mesures d'enthalpie de rétrogradation déterminées pour chacun des 4 produits testés au cours de 12 cycles successifs de gel/dégel.

5 **Tableau I.** Détermination des enthalpies de rétrogradation au cours des 12 cycles de gel/dégel, exprimées en J/g de préparation.

PRODUITS	Cycle 2	Cycle 4	Cycle 6	Cycle 8	Cycle 12
A	0	0	0	0	0,2
B	0	0	0	0	0
C	0	0	0,4	1	2,2
D	0	0,10	0,35	0,6	1,75

10 Les polymères de glucose branchés présentent donc une remarquable stabilité, même après 12 cycles de gel/dégel. Si l'amidon waxy (produit C) et l'amidon waxy réticulé et acétylé (produit D) commencent à rétrograder à partir du 4^{ème} cycle de gel/dégel, il n'en est pas de même pour chacun
15 des polymères de glucose branchés conformes à l'invention préparés à partir dudit amidon waxy. Le procédé enzymatique mis en oeuvre pour modifier les amidons et dérivés d'amidon permet donc de leur assurer une excellente stabilité, bien supérieure en l'état aux amidons waxy stabilisés et/ou
20 réticulés.

EXEMPLE 3

La caractérisation rhéologique des polymères de glucose branchés est réalisée à l'aide d'un Rapid Visco
25 Analyser (RVA).

Les produits conformes à l'invention présentant une remarquable solubilité dans l'eau froide.

Il a donc été nécessaire de mettre au point une méthode de détermination de viscosité propre à ce type de produit.

Comme indiqué dans le test B, 4,5 g du produit sec à tester sont mélangés avec du glycérol et de l'eau pour atteindre une masse finale de 28 g.

Les produits analysés sont d'une part, les produits A, B et C décrits dans l'exemple 2 et deux autres produits E et F, correspondants à des amidons de maïs waxy fluidifiés à deux niveaux de fluidification (valeur appréciée par la mesure classique de la fluidité dans l'eau, i.e. l'indice de " water fluidity " ou WF), obtenus par traitement en conditions acides connues en soi par l'homme du métier, le produit E présentant un WF de 50, et le produit F, un WF de 65.

Le profil d'analyse temps / température et vitesse dans le RVA est alors réalisé comme suit. L'échantillon est agité à 100 rpm à une température de 25°C durant 5 s, puis à 500 rpm pendant 25 s. L'agitation est alors maintenue à 160 rpm durant le reste du profil.

La température initiale de 25 °C est maintenue durant 10 min, puis elle est augmentée à 90°C en 8 min.

Cette température de 90°C est ensuite maintenue 3 min, diminuée à 30°C en 8 min, puis maintenue à cette valeur de 30°C durant 5 min.

Le tableau II suivant présente les résultats de viscosité pour les produits A, B, C, E et F, exprimés en centipoises.

Tableau II. Détermination des viscosités en fin de profil temps/température et vitesse en RVA des produits A, B, C, E et F, exprimées en centi-Poises (cP)

PRODUITS	Viscosité à 34 min
A	1600
B	750
C	6060
E	1140
F	660

Les polymères de glucose branchés conformes à l'invention présentent encore une certaine viscosité, mais
5 remarquablement plus faible que celle du témoin amidon waxy (C).

On remarque que ces valeurs de viscosité sont du même ordre de grandeur que les amidons waxy fluidifiés.

Une étude complémentaire est réalisée par mesure de
10 la viscosité après stockage durant 7 jours à 4°C.

Cette étude permet de caractériser la stabilité des colles ainsi fabriquées dans le temps et de déterminer en quoi les polymères de glucose branchés conformes à l'invention diffèrent des amidons waxy fluidifiés.

15 On réalise le stockage des bols du RVA contenant chacun des cinq produits à 4°C.

La viscosité est ensuite à nouveau déterminée par le RVA. Le profil d'analyse temps / température et vitesse est alors caractérisé par une vitesse et une température
20 maintenues respectivement à 160 et 30°C pendant 20 min.

La viscosité retenue est la viscosité moyenne mesurée en cP entre 15 et 20 min.

Le tableau III suivant présente les résultats de viscosité obtenus après 7 jours de stockage à 4°C des
25 produits A, B, C, E et F.

Tableau III. Détermination des viscosités des produits après stockage pendant 7 jours à 4°C, exprimées en cP.

PRODUITS	Viscosité après 7 jours à 4 °C
A	2500
B	850
C	8650
E	Gel blanc, dur, ferme*
F	Gel blanc, dur, ferme*

5 * : viscosité non mesurable.

Les résultats montrent clairement que les polymères de glucose branchés conformes à l'invention présentent une viscosité remarquablement stable même après un stockage à 4°C. Cette faible viscosité peut donc être mise à profit
10 avantageusement pour des préparations alimentaires qui nécessitent que l'ingrédient amylacé qui les composent soit de faible viscosité (telles que les préparations liquides instantanées) et qui demandent à être stockées pendant une
15 longue période de temps à basses températures.

EXEMPLE 4

On prépare des polymères solubles de glucose branchés conformes à l'invention, en faisant agir une enzyme de
20 branchement du glycogène isolée de *E. coli* sur divers solutions d'amidons et dérivés d'amidon, pendant 21 heures de réaction à 30°C et conformément aux autres conditions décrites dans l'exemple 1.

25 Il s'agit en l'occurrence ici de suspensions d'amidon standard de maïs (G), d'amidon de maïs waxy (I), d'amidon

riche en amylose commercialisé par la société Demanderesse sous le nom d'EURLON[®] 7 (K) et d'une maltodextrine commercialisée par la société Demanderesse sous le nom de GLUCIDEX[®] 2 (M).

5 Le tableau IV suivant présente les résultats obtenus en terme de teneurs en liaisons glucosidiques α -1,6, de valeur des Mp centrées du profil de distribution des poids moléculaires, de teneur en sucres réducteurs et de comportement de rétrogradation après 10 cycles de
10 gel/dégel.

Tableau IV. Détermination des caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des polymères solubles de glucose conformes à l'invention H, J, L et N obtenus par
15 l'action de l'enzyme de branchement du glycogène de *E. coli* respectivement sur les substrats G, I, K et M à une matière sèche donnée.

	G 10% MS	H	I 1% MS	J	K 5 % MS	L	M 20% MS	N
Teneur en liaisons glucosidiques α -1,6 (%)	3	3,4	4,4	5,6	1,9	3,3	6,1	7,1
Valeur de Mp centrée (daltons)	5.10^7	$5,8.10^5$	1.10^8	$2,2.10^5$	$8,5.10^6$	5.10^5	$3,3.10^5$	$1,4.10^5$
Teneur en sucres réducteurs	0,13	0,16	< 0,5	< 0,05	0,5	0,5	3	3,5
Enthalpies de rétrogradation (J/g)	2	1	1,5	0	3	0,4	2,3	0

20 Les polymères solubles de glucoses branchés conformes à l'invention présentent donc une remarquable tenue au gel/dégel et une distribution des poids moléculaires centrés sur un fin intervalle de valeurs compris entre 1,4

et $5,8 \cdot 10^5$ daltons, alors que les substrats de départ présentent au contraire une forte tendance à la rétrogradation et des profils de distribution des poids moléculaires étalés de 10^3 à 10^8 daltons.

REVENDEICATIONS

1. Polymères solubles de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons β glucosidiques, caractérisés par le fait qu'ils présentent :
- entre 2,5 et 10 % de liaisons glucosidiques α -1,6,
 - une tendance très faible ou nulle à la rétrogradation en solution aqueuse, déterminée selon un test A,
 - un Mp déterminé selon un test C à une valeur centrée du profil de distribution des masses moléculaires comprise entre 10^4 et 10^8 daltons,
 - une teneur en sucres réducteurs au plus égale à 9 %.

2. Polymères solubles de glucose branchés selon la revendication 1, caractérisés par le fait qu'ils présentent une viscosité déterminée selon un test B au plus égale à 5.000 cP.

3. Polymères de glucose branchés selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisés par le fait qu'ils présentent :
- entre 2,5 et 5 % de liaisons glucosidiques α -1,6,
 - un Mp déterminé selon un test C à une valeur centrée du profil de distribution des masses moléculaires comprise entre 10^5 et 10^6 daltons,
 - une teneur en sucres réducteurs au plus égale à 1 %.

4. Polymères de glucose branchés selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisés par le fait qu'ils présentent :
- entre 5 et 10 % de liaisons glucosidiques α -1,6,
 - un Mp déterminé selon un test C à une valeur centrée du profil de distribution des masses moléculaires comprise entre 10^7 et 10^8 daltons,

- une teneur en sucres réducteurs comprise entre 5,5 au plus 9 %.

5. Procédé de fabrication de polymères de glucose branchés ne contenant substantiellement pas de liaisons β glucosidiques conformes à l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'on :

- 10 a) soumet une suspension aqueuse d'amidon ou de dérivé d'amidon d'une matière sèche au moins égale 1 % en poids, de préférence de 1 à 50 % en poids, à une température supérieure à 130°C, de préférence comprise entre 140 et 150°C, sous une pression de plus de 3,5 bars, de préférence comprise entre 4 à 5 bars pendant au moins 2 min, de préférence pendant 2 à 5 min,
- 15 b) traite l'amidon ou le dérivé amidon ainsi obtenu avec 50 à 2.000 unités d'enzyme de branchement purifiée à une température comprise entre 25 et 50°C, de préférence à une température de 30°C, pendant une durée de 10 min à 24h,
- 20 c) recueille les polymères de glucose branchés ainsi obtenus.

6. Procédé de fabrication de polymères solubles de glucose branchés selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'enzyme de branchement est choisie dans le groupe constitué par les enzymes de branchement du glycogène, les enzymes de branchement de l'amidon et les mélanges quelconques de ces enzymes.

7. Procédé de fabrication de polymères solubles de glucose branchés selon l'une ou l'autre des revendications 5 et 6, caractérisé par le fait que l'enzyme de branchement est extraite d'organismes et/ou de micro-organismes choisis dans le groupe constitué par les plantes supérieures, les

levures, les bactéries et les algues unicellulaires, et est de préférence extraite d'algues unicellulaires.

8. Procédé de fabrication de polymères solubles de glucose branchés selon la revendication 7, caractérisé par
5 le fait que l'enzyme de branchement extraite d'algues est obtenue par isolement à partir d'un organisme génétiquement modifié capable d'exprimer la dite enzyme.

9. Compositions destinées à être utilisées dans les industries notamment du Papier-Carton, du Textile, de la
10 Pharmacie, de la Cosmétique, et en particulier de l'Alimentaire, caractérisées en ce qu'elles renferment les polymères de glucose branchés selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou susceptibles d'être obtenus selon l'une des revendications 5 à 8.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08B30/12 C12P19/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 499 588 A (KABUSHIKI KAISHA. HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 13 February 1982 (1982-02-13) page 2, line 20 -page 3, line 13	1-7,9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 11, 13 September 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 143650, KURIKI TAKASHI ET AL.: "Application of cluster dextrin as food ingredient." XP002127630 abstract & NIPPON SHOKUHIN SHINSOZAI KENKYUKAISHI, vol. 1, no. 1, 1998, pages 15-22, jp	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2000

Date of mailing of the international search report

09/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01109

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2499588 A	13-08-1982	JP 1446808 C	30-06-1988
		JP 57138387 A	26-08-1982
		JP 62053148 B	09-11-1987
		JP 1191275 C	29-02-1984
		JP 57132850 A	17-08-1982
		JP 58022182 B	07-05-1983
		GB 2095681 A,B	06-10-1982
		US 4454161 A	12-06-1984

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01109

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C08B30/12 C12P19/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C08B C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 499 588 A (KABUSHIKI KAISHA. HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 13 février 1982 (1982-02-13) page 2, ligne 20 -page 3, ligne 13	1-7,9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 11, 13 septembre 1999 (1999-09-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 143650, KURIKI TAKASHI ET AL.: "Application of cluster dextrin as food ingredient." XP002127630 abrégé & NIPPON SHOKUJIN SHINSOZAI KENKYUKAISHI, vol. 1, no. 1, 1998, pages 15-22, jp	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche internationale No

PCT/FR 00/01109

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2499588 A	13-08-1982	JP 1446808 C	30-06-1988
		JP 57138387 A	26-08-1982
		JP 62053148 B	09-11-1987
		JP 1191275 C	29-02-1984
		JP 57132850 A	17-08-1982
		JP 58022182 B	07-05-1983
		GB 2095681 A,B	06-10-1982
		US 4454161 A	12-06-1984

“ATE”

Demande de brevet d'invention

déposée en FRANCE le : 25 septembre 1998

sous le n° 98 12051

Titulaire : ROQUETTE FRERES

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PROCEDE DE PREPARATION D'UN MELANGE D'ENZYMES DE
BRANCHEMENT DE L'AMIDON EXTRAITES D'ALGUES

La présente invention est relative à un procédé de
préparation d'un mélange d'enzymes de branchement de
5 l'amidon extraites d'algues unicellulaires.

La présente invention a également pour objet un procédé
de modification de l'amidon et de ses dérivés mettant en
oeuvre ledit mélange, ainsi que l'amidon et les dérivés
d'amidon modifiés ainsi obtenus.

10 On entend par "amidon", au sens de la présente
invention, l'amidon naturel ou hybride issu de pomme de
terre, de pomme de terre à haute teneur à amylopectine
(fécule waxy), de maïs, de blé, de maïs à haute teneur en
amylopectine (maïs waxy), de maïs à haute teneur en amylose,
15 de riz, de pois ou de manioc, les coupes ou fractions qui
peuvent être faites ou obtenues des amidons, telles que
l'amylose, l'amylopectine, les coupes granulométriques
connues de l'homme de l'art sous les vocables d'amidon de
blé "A" et amidon de blé "B", et les mélanges
20 quelconques d'au moins deux quelconques des produits
susmentionnés.

Au sens de l'invention, on entend en particulier par
"dérivés d'amidon", l'ensemble des amidons modifiés issus
de la modification enzymatique, chimique et/ou physique, en
25 une ou plusieurs étapes, de cet amidon.

Les dérivés d'amidon peuvent notamment être les amidons
modifiés par l'une au moins des techniques connues
d'éthérification, d'estérification, de réticulation,
d'oxydation, de traitement alcalin, d'hydrolyse acide et/ou
30 enzymatique.

La présente invention concerne également une
composition enzymatique contenant des enzymes de branchement
de l'amidon extraites d'algues unicellulaires,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

significativement appauvrie en enzymes à activité amylasique et débranchante de l'amidon.

Habituellement, les sources les plus importantes et les plus variées d'enzymes de branchement, encore appelées enzymes de ramification, se trouvent chez les plantes où elles participent à l'édification du polymère de réserve qu'est l'amidon. Ces enzymes sont plus particulièrement impliquées dans la synthèse de la fraction ramifiée de l'amidon, l'amylopectine, et dans la synthèse des quelques points de branchement de la fraction linéaire de l'amidon, l'amylose.

Ces enzymes de branchement de l'amidon catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -1,4 et leur transformation en liaisons glucosidiques α -1,6. Ces enzymes sont donc des enzymes de transfert, nommément des 1,4- α -D-glucan : 1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transférases.

Ces enzymes sont donc avantageusement utilisées dans les domaines d'application où il y a nécessité de disposer d'amidon ou de dérivés d'amidon présentant une structure plus ramifiée que celle des amidons ou des dérivés d'amidons standards, par exemple dans des applications où l'indigestibilité et/ou l'absence de tendance à la rétrogradation de l'amidon ou de ses dérivés sont recherchées.

Les enzymes de branchement de l'amidon sont d'une grande diversité. On les range habituellement en deux classes : les enzymes de branchement de l'amidon de type I et celles de type II.

Les enzymes de branchement de type I branchent les structures linéaires telles que l'amylose, à une vitesse plus élevée que l'amylopectine et elles transfèrent préférentiellement de longues chaînes glucosidiques (Degré

THIS PAGE BLANK (USPTO)

de Polymérisation ou D.P. moyen de ces chaînes compris entre 10 et 30).

5 A l'inverse, les enzymes de branchement de type II branchent les structures linéaires telles que l'amylose, à une vitesse plus basse que l'amylopectine et transfèrent préférentiellement de plus courtes chaînes glucosidiques (D.P. moyen compris entre 3 et 9, et notamment D.P. 6 et D.P. 7).

10 Les spécialistes dans le domaine de l'utilisation des enzymes de ramification s'accordent à dire que la préparation des enzymes de branchement de l'amidon à partir des plantes supérieures n'est réalisable industriellement qu'en ayant recours aux techniques de l'ADN recombinant, qui nécessitent cependant de mettre en oeuvre des travaux longs et coûteux.

15 Dans ces conditions, il est souvent décidé d'entreprendre les recherches des enzymes de ramification dans le monde microbien où l'accessibilité auxdites enzymes est plus aisée qu'à partir des plantes supérieures.

20 On entend par monde microbien l'ensemble des micro-organismes vivants tels que notamment les bactéries, les levures, les moisissures et les algues unicellulaires.

25 Les enzymes de branchement que l'on peut isoler des bactéries ou des levures et qui sont capables de modifier l'amidon et ses dérivés sont les enzymes de branchement qui participent à la synthèse d'un autre polymère de réserve, le glycogène. Ces enzymes de branchement du glycogène appartiennent au même groupe que les enzymes de branchement de l'amidon, même si leur spécificité d'action est
30 différente, et ce surtout en termes de longueur de chaînes glucosidiques transférées (D.P. moyen de 3 à 5).

Le brevet US 4 454 161 décrit par exemple une enzyme de branchement du glycogène isolée de *Bacillus megaterium*,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

utilisée pour améliorer la qualité de l'amidon de différents aliments, en empêchant la tendance à la rétrogradation des structures préparées à partir de l'amidon et en augmentant leur indigestibilité et donc leurs propriétés de fibres alimentaires.

Le brevet EP 418 945 revendique également, pour la même application que celle mentionnée ci-dessus, l'utilisation d'une enzyme de branchement du glycogène thermostable et isolée de *Bacillus stearothermophilus*.

Cependant, si ces deux brevets montrent que l'on peut aisément produire et utiliser les enzymes de branchement du glycogène pour modifier l'amidon et ses dérivés, ce type d'enzyme est loin d'égaliser la spécificité et la diversité d'actions des enzymes végétales de branchement de l'amidon. Ces enzymes ne répondent donc pas à la demande sans cesse croissante d'une plus grande variété de composés ramifiés nouveaux dans leurs structures et dans leurs propriétés.

Pour remédier aux inconvénients des enzymes de branchement du glycogène, une source avantageuse d'enzymes de ramification consiste en l'algue unicellulaire, qui accumule de l'amidon et possède donc, tout comme les plantes supérieures, des enzymes de branchement de l'amidon.

Les enzymes de branchement que l'on peut isoler des algues unicellulaires ont été décrites par FREDERICK (1973, Ann. N. Y. Acad. Sci., 210, 254-264), qui a été l'un des premiers à rapporter l'existence d'une enzyme Q dans l'algue *Chlorella pyrenoidosa*, enzyme capable de transférer sur l'amylose une distribution de longueur de chaînes glucosidiques caractéristique de l'amylopectine.

Cette enzyme a été purifiée à partir de gels de polyacrylamide dans lesquels on a fait migrer par électrophorèse toutes les enzymes extraites de cette algue.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cependant, un tel procédé électrophorétique, relevant des techniques analytiques, ne peut en aucune manière conduire à l'obtention d'une quantité suffisante d'enzymes qui puisse permettre d'en envisager une application industrielle visant à transformer, en les branchant, de l'amidon ou ses dérivés.

Il est donc nécessaire d'avoir recours aux techniques classiques de purification des enzymes de branchement de l'amidon à partir des plantes supérieures, si l'on souhaite disposer de quantités plus importantes d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires.

Cependant, la mise en oeuvre des méthodes d'extraction et de purification des enzymes de branchement de l'amidon s'accompagne d'un certain nombre de difficultés, liées à la présence d'enzymes contaminantes qui perturbent, voire inhibent l'activité desdites enzymes de branchement.

Deux catégories d'enzymes contaminantes sont généralement décrites lors des procédés de purification des enzymes de branchement de l'amidon que l'on extrait à partir des plantes supérieures, enzymes contaminantes présentes également chez les algues unicellulaires.

Il s'agit des enzymes à activité amylasique et des enzymes à activité débranchante de l'amidon (principalement à activité de type isoamylase qui hydrolysent spécifiquement les liaisons α -1,6).

L'élimination des activités amylasiques contaminantes conditionne la stabilité des produits branchés que l'on obtient après avoir fait agir les enzymes de branchement sur les amidons ou ses dérivés. Sans cette précaution, les produits de branchement seraient partiellement ou totalement dégradés.

L'élimination des enzymes à activité amylasique est donc, habituellement considérée comme la première opération

THIS PAGE BLANK (USPTO)

à réaliser en préalable à tout procédé de purification proprement dit.

5 Cette élimination des activités amylasiques est effectuée par séparation chromatographique, généralement par chromatographie échangeuse d'anions (Mac DONALD et PREISS, 1983, *Plant Physiol.*, 73, 175-178 et 1985, *Plant Physiol.*, 78, 849-852).

10 Les enzymes à activité débranchante constituent cependant le problème majeur rencontré pour l'isolement des enzymes de branchement de l'amidon. En effet, ces enzymes débranchantes sont co-purifiées avec les enzymes de branchement de l'amidon, car elles possèdent des propriétés physico-chimiques voisines.

15 Dans ces conditions, pour préparer sélectivement les enzymes de branchement de l'amidon, et quelle que soit la méthode de purification employée, il faut avoir recours à des conditions opératoires et des étapes de séparation chromatographique supplémentaires tout à fait particulières et lourdes, ce qui complique alors les procédés de
20 préparation des enzymes de branchement de l'amidon.

On constate donc que les procédés permettant de préparer les enzymes végétales de branchement de l'amidon décrits dans l'état de la technique présentent tous l'inconvénient de nécessiter de multiples étapes de
25 purification longues et fastidieuses.

Il résulte de ce qui précède qu'il y a donc nécessité de trouver un moyen permettant :

30 - de disposer d'une plus grande variété d'enzymes de branchement de l'amidon, afin de conduire à l'obtention d'amidon et de dérivés d'amidon originaux tant dans leurs structures que dans leurs propriétés, ceci de manière à trouver de nouvelles applications à l'amidon et ses dérivés notamment en industrie alimentaire, et

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- de préparer de manière simple, efficace et industrialisable ces enzymes de branchement de l'amidon.

La société Demanderesse a trouvé, après de nombreuses recherches, qu'un tel moyen pouvait consister en un procédé
5 particulier de préparation d'enzymes de branchement de l'amidon à partir d'algues unicellulaires.

De manière plus précise, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires,
10 caractérisé par le fait que l'on :

- a. modifie une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon,
- b. traite cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré,
- 15 c. effectue un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir ledit mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

Le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon selon l'invention est constitué de l'ensemble des enzymes de
20 branchement de l'amidon de type I et de type II de l'algue unicellulaire.

La première étape du procédé conforme à l'invention consiste à modifier une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon.

25 Ce faisant, la société Demanderesse a vaincu un préjugé technique particulièrement fort, puisqu'il a toujours été recommandé d'éliminer en premier lieu les activités amylasiques contaminantes. En effet, ces activités enzymatiques gênent les mesures des activités de branchement
30 de l'amidon effectuées dans les différentes fractions prélevées au cours des étapes de purification.

La société Demanderesse a cependant trouvé que l'utilisation d'algues unicellulaires se prêtait

THIS PAGE BLANK (USPTO)

avantageusement à une étape préalable d'élimination de l'activité débranchante de l'amidon, ce qui permet alors de séparer efficacement les enzymes de branchement des enzymes de débranchement de l'amidon.

5 La société Demanderesse a donc imaginé de modifier l'algue unicellulaire pour en éliminer l'activité enzymatique de débranchement de l'amidon plutôt que de mettre en oeuvre comme habituellement une étape de séparation chromatographique.

10 De manière préférentielle, on modifie l'algue unicellulaire par mutation, et plus particulièrement encore par mutation par insertion au locus du gène codant pour l'enzyme débranchante de l'amidon.

15 On entend par locus, la position sur le chromosome où est localisé le gène codant pour l'enzyme d'intérêt, en l'occurrence ici l'enzyme de débranchement de l'amidon.

20 La mutation par insertion, connue de l'homme du métier, consiste à favoriser l'intégration ponctuelle de fragments d'ADN dans le génome de l'algue unicellulaire. La sélection des mutants qui ne produisent plus d'amidon mais accumulent du phytoglycogène permet d'isoler les mutants d'insertion au locus codant pour l'enzyme débranchante de l'amidon.

25 On choisit comme algue unicellulaire, une algue de l'ordre de volvocales, préférentiellement de la famille des chlorophyceae et avantageusement l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. De manière encore plus préférentielle, on choisit une algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* dépourvue d'activité débranchante de l'amidon par mutation par insertion au niveau du locus *sta 7*.

30 La deuxième étape du procédé conforme à l'invention consiste à traiter cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Dans le cadre de la présente invention, l'extrait a-cellulaire est défini comme l'ensemble des protéines à activités enzymatiques ou non, qui seront extraites du concentrat d'algues unicellulaires.

5 On obtient cet extrait a-cellulaire en réalisant tout d'abord une culture de cette algue unicellulaire modifiée à grande échelle, de manière à obtenir une culture de densité cellulaire optimale.

10 Cette culture est à adapter à la physiologie de l'algue unicellulaire considérée, en termes de sources carbonées et azotées directement assimilables, de durée et de conduite de fermentation.

15 Pour l'algue mutante *Chlamydomonas reinhardtii*, on conduit la culture de préférence jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance.

20 On concentre ensuite la suspension cellulaire obtenue au terme de la culture précédente par le moyen d'un séparateur de cellules, par exemple par centrifugation ou filtration sur un support dont la porosité est adaptée à la taille des cellules collectées.

25 Pour l'algue mutante *Chlamydomonas reinhardtii*, on conduit par exemple cette étape de concentration par centrifugation de manière à atteindre une densité préférentiellement supérieure à 10^9 cellules/ml, valeur pour laquelle la société Demanderesse a obtenu le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon avec le meilleur rendement.

30 L'extrait a-cellulaire est enfin obtenu à partir du concentrat d'algues unicellulaires par rupture des enveloppes membranaires des algues unicellulaires par toute méthode de lyse connue de l'homme du métier, notamment de manière mécanique, sonique, chimique ou enzymatique. Selon un mode préférentiel de réalisation conforme à l'invention,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

on choisit d'effectuer une lyse mécanique, par exemple par le broyage des algues unicellulaires concentrées à la presse de FRENCH puis filtration pour éliminer les débris insolubles.

5 La troisième étape du procédé conforme à l'invention consiste à effectuer un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

10 Cette étape de tamisage moléculaire peut consister avantageusement en une séparation chromatographique ou en une séparation sur membrane d'ultrafiltration, de préférence une séparation chromatographique sur gel filtration.

15 Préalablement à cette étape, il peut être avantageux d'éliminer les composés hydrophobes susceptibles de diminuer l'efficacité de l'étape de tamisage moléculaire. Ces composés hydrophobes sont principalement constitués par les pigments chlorophylliens de l'algue unicellulaire.

 Ce résultat est obtenu par exemple par précipitation ou par traitement chromatographique desdits pigments.

20 On choisit avantageusement, afin de limiter au maximum les étapes de séparations chromatographiques, la précipitation des pigments au polyéthylène glycol et préférentiellement, à la protamine sulfate.

25 L'étape de tamisage moléculaire permet de fractionner l'ensemble des protéines, à activités enzymatiques ou non, extraites du concentrat d'algues unicellulaires et de récupérer les fractions de poids moléculaires correspondant à la taille des enzymes de branchement de l'amidon, taille habituellement comprise entre 70 000 et 90 000 daltons.

30 Selon un mode préférentiel conforme à l'invention, on choisit une colonne de gel filtration dont le support présente une porosité qui permet de résoudre des protéines

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dont la taille moléculaire est celle des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

5 Pour ce faire, on peut utiliser une colonne de gel filtration de type allyl-dextran-séphacryl, de gamme de fractionnement 1 000 à 100 000 daltons, qui conduit ainsi en un seul passage à obtenir un mélange d'enzymes où les activités de branchement de l'amidon sont présentes dans les premières fractions d'élution.

10 La mesure des activités amylasiques, mais aussi celle des activités de branchement de l'amidon, est effectuée dans chacune des fractions collectées.

15 De manière surprenante et inattendue, la société Demanderesse a constaté que l'on obtient ainsi, par la récupération des toutes premières fractions éluées, le mélange des enzymes de branchement de l'amidon débarrassé également de tout ou grande partie des activités amylasiques.

20 Le procédé conforme à l'invention conduit en fait à une élution retardée des protéines à activités amylasiques au bénéfice des enzymes à activités de branchement de l'amidon.

25 Toutes les fractions enrichies en activités de branchement, et débarrassées de tout ou grande partie des activités amylasiques sont finalement rassemblées et constituent le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires conforme à l'invention.

30 De manière générale, on obtient ainsi en tant que produit nouveau, une composition enzymatique caractérisée en ce qu'elle contient un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon de type I et de type II extraites d'algues unicellulaires et en ce qu'elle est significativement, voire totalement appauvrie en enzymes à activités amylasique et débranchante de l'amidon.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Les enzymes de branchement de l'amidon obtenues en mélange et contenues dans la composition enzymatique selon l'invention vont ensuite permettre d'effectuer la modification des amidons et/ou ses dérivés.

5 De manière préférentielle, on choisit de modifier une structure dérivée de l'amidon déjà branchée, et plus préférentiellement l'amylopectine.

10 La modification d'une structure polyglucosylée de type amylopectine est déterminée dans un premier temps par la mesure de la variation de la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe formé entre l'amylopectine modifiée et l'iode, par rapport à la longueur d'onde du témoin amylopectine non modifiée. Une variation de plus de 10nm traduit une modification significative de la structure de
15 départ.

On mesure également la taille des chaînes glucosidiques transférées sur l'amylopectine en réalisant, *in vitro*, l'incubation de l'amylopectine avec le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues, son
20 traitement à l'isoamylase de manière à cliver tous les points de branchement en O-1,6, et la détermination de la longueur des chaînes ainsi libérées par méthodes chromatographiques, par exemple par chromatographie anionique avec détection ampérométrique.

25 On réalise ensuite la comparaison des longueurs de chaînes ainsi obtenues avec celles libérées de l'amylopectine standard débranchée par la même technique, ce qui permet de caractériser l'amylopectine modifiée.

30 Les chromatogrammes obtenus par chromatographie anionique avec détection ampérométrique (DIONEX) indiquent habituellement une majorité de chaînes de D.P. 6, D.P. 7 et D.P. 8, avec très peu de D.P. 1 à D.P. 5 pour l'amylopectine

THIS PAGE BLANK (USPTO)

standard, alors que l'on obtient au contraire une majorité de chaînes de D.P. 1 à D.P. 5 pour l'amylopectine modifiée.

En regard des profils de distribution des longueurs de chaînes transférées par les enzymes de branchement de l'amidon des plantes supérieures (D.P. moyen de 10 à 30 pour les enzymes de branchement de l'amidon de type I et D.P. moyen de 6 à 7 pour les enzymes de branchement de l'amidon de type II), les produits obtenus après modification par le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues sont, à la connaissance de la société Demanderesse, nouveaux.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples non limitatifs décrits ci-dessous.

Exemple 1. Obtention d'une algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* dépourvue d'activités débranchantes de l'amidon.

La stratégie choisie repose sur l'introduction d'une mutation par insertion chromosomique de plasmide dans *Chlamydomonas reinhardtii*, en suivant le protocole établi par KINDLE et al., 1989, in *The Journ. Cell Biol.*, 109, 2589-2601.

Une souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii* sans paroi, défectueuse pour l'arginosuccinate lyase, est cultivée sur milieu HSA (E. HARRIS Ed., 1989, 25-63. Academic Press, San Diego, Calif.) complémenté en arginine à raison de 1 ml de solution à 100 mg/l d'arginine stérile par litre de culture. Les cultures sont stoppées en phase exponentielle de croissance, à la densité cellulaire de 2.10^6 cellules/ml et concentrées à 2.10^8 cellules/ml par centrifugation à 3 000 g pendant 10 min.

Dans un tube de 15 ml, 0,5 ml de cette suspension cellulaire sont mélangés avec 0,5 ml de billes de verre de

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 mm de diamètre et 10 µg d'ADN constitués par le plasmide pARG7.8, dans lequel a été introduit une séquence de 7,8 kbp issue du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* et codant pour l'argino-succinate lyase. Les tubes sont ensuite
5 agités vigoureusement pendant 1 min. Après ajout de 10 ml de milieu HSA complémenté en arginine, les cellules sont immédiatement transférées dans un second tube, pour éliminer les billes de verre.

Après centrifugation à 3 000 g pendant 10 min, les
10 cellules sont reprises dans 400 µl du milieu HSA et étalées sur milieu gélosé HSA sans arginine.

Les 15 000 transformants ainsi obtenus, devenus prototrophes pour l'arginine, sont ensuite criblés afin de trouver les souches déficientes pour la biosynthèse de
15 l'amidon. Après 5 jours de culture sur milieu gélosé carencé en azote, les colonies sont colorées par les vapeurs d'iode directement sur la boîte de Pétri. Les colonies sauvages apparaissant bleu-nuit, tous les autres transformants sont sélectionnés.

A l'issue de cette mutagenèse, les souches d'un
20 phénotype nouveau sont isolées. Celles-ci présentent une production d'amidon réduite à moins de 0,1% de celle accumulée chez la souche sauvage. Ce phénotype original résulte de l'altération du gène *STA 7*, responsable de la
25 synthèse de l'activité débranchante de l'amidon.

Exemple 2. Culture de l'algue mutante et obtention de l'extrait a-cellulaire dépigmenté.

On cultive l'algue mutante en milieu HSA jusqu'à
atteindre une densité cellulaire de $9 \cdot 10^6$ cellules/ml,
30 caractéristique de la phase stationnaire.

On inocule ensuite 10 litres de milieu HSA avec la culture précédente de manière à obtenir une densité cellulaire initiale de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml, en maintenant une

THIS PAGE BLANK (USPTO)

agitation constante et sous lumière continue de 2 000 à 4 000 lux. Les cultures sont arrêtées lorsque leur concentration finale est de $4 \cdot 10^6$ cellules/ml. On concentre les algues unicellulaires à $4,5 \cdot 10^9$ cellules/ml. Les cellules ainsi récupérées sont lysées mécaniquement par deux passages à la presse de FRENCH à une pression de $7 \cdot 10^7$ Pa.

Les protéines de l'extrait sont dosées par la méthode de BRADFORD (Kit de dosage commercialisé par la société BIO-RAD).

Les extraits a-cellulaires sont soumis à une précipitation des pigments par traitement à 50 μ l/ml de protamine sulfate à 10 % pendant 15 mn dans la glace, puis centrifugés à nouveau à 10 000 g pendant 15 min à 4°C afin de récupérer le surnageant. Pour amener le volume d'extrait à 2 ml, on précipite ledit surnageant au sulfate d'ammonium à 35 %. Sur les 287 mg de protéines totales obtenus dans l'extrait brut, les étapes de dépigmentation et de précipitation au sulfate d'ammonium ont conduit à récupérer 75 mg de protéines totales, et ont permis d'éliminer 50 % des protéines autres que les enzymes de branchement de l'amidon.

Exemple 3. Séparation chromatographique et préparation du mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

Les 75 mg de protéines dans 2 ml d'échantillon sont déposés sur une colonne FPLC S100 / séphacryl 2,6 x 60 cm de PHARMACIA sur un support allyle dextran ponté par du N,N' méthylène bis-acrylamide en gel sphérique d'un diamètre de 25 à 75 μ m caractérisé par sa gamme de fractionnement comprise entre 1 000 et 100 000 daltons.

Le débit de sortie de la colonne est fixé à 2 ml/min et des fractions de 2 ml sont récupérées par un collecteur de

THIS PAGE BLANK (USPTO)

fractions commercialisé par la société PHARMACIA. Le tampon d'élution utilisé est un tampon Acétate renfermant de l'acétate de sodium 50 mM et du dithiothreitol 10 mM, le pH étant ajusté à 6 par l'acide acétique.

5 On réalise le dosage des activités de branchement dans toutes les fractions collectées par la méthode de dosage indirecte à la phosphorylase A.

10 20 µl d'échantillons sont ajoutés à 180 µl d'un mélange réactionnel renfermant du citrate de sodium 250 mM à pH 7, de l'adénosine 5' monophosphate 1 mM, de la phosphorylase A de muscle de lapin à 0,2 µg/µl, du glucose-1-phosphate 45 mM et du [U-14C] glucose-1-phosphate à 3,8 µM (dont la radioactivité spécifique est de $10,5 \cdot 10^9$ Bq/mmol).

15 Après une heure à 30°C, la réaction est arrêtée par ajout de 800 µl d'acide trichloroacétique 10 %. Les précipités, après une nuit à 4°C, sont filtrés sur papier WHATMAN de porosité 1 µm, rincés par 5 ml d'acide trichloroacétique 5%, par 5 ml d'eau, et enfin par 5 ml d'éthanol à 70 %. Le comptage radioactif est réalisé par un
20 compteur BECKMAN après avoir placé les filtres dans des fioles de comptage contenant 3 ml de liquide scintillant.

Une unité d'enzyme de branchement se définit dans de telles conditions comme une nanomole de glucose-1-phosphate incorporée par minute.

25 On réalise ensuite le dosage des activités amylasiques sur chaque fraction. 100 µl de chaque fraction vont être soumis à une dénaturation des protéines à 100°C pendant 5 mn en présence de sodium dodécyl-sulfate 1% et mercaptoéthanol 5% dans un volume final de 115 µl, puis déposés sur un gel
30 de polyacrylamide (30/1 de acrylamide/bis-acrylamide) à 7,5 % , tris HCl 250 mM pH 8,8 et SDS 0,1 %, contenant 0,3 % d'amidon soluble de pomme de terre pour l'analyse en suivant la technique dite du zymogramme amidon.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Les activités hydrolytiques vont entraîner une hydrolyse locale de l'amidon contenu dans le gel et sont visualisées après migration (électrophorèse de 70 mn à 15 V cm⁻¹ ; température ambiante; tampon : tris-glycine 25 mM pH 8,3 , dithiothreitol 1 mM, sodium dodécyl-sulfate 0,1 %), renaturation (2 heures sous agitation lente; température ambiante; tampon tris 40 mM), incubation (une nuit sous agitation lente à température ambiante en tampon tris-glycine 25 mM à pH 8,3 et dithiothreitol 20 mM) et enfin coloration à l'iode.

La couleur des dextrines résiduelles engendrée par l'action de ces enzymes renseigne sur la nature de l'activité enzymatique détectée.

Les 8 premières fractions, représentant 16 ml, pour lesquelles l'activité des enzymes de branchement est optimale (de l'ordre de 17 340 unités d'activité de branchement), et les activités amylasiques minimales (peu ou pas d'activité amylasique visualisée sur gel) constitueront le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites de l'algue.

Exemple 4. Modification de l'amylopectine de maïs par le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites de l'algue.

On réalise d'abord l'estimation des activités branchantes de l'amidon du mélange des enzymes d'algues, par la mesure de la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe formé par l'amylopectine modifié avec l'iode. 300 µl de mélange d'enzymes contenant 131 unités d'activité de branchement sont ajoutés à 10 µl d'une solution à 15 µg/µl d'amylopectine commerciale de maïs obtenue par dissolution de 225 mg dans 12 ml de diméthylsulfoxyde 90 % pendant 10 mn à 100°C, suivi de la précipitation par 36 ml d'éthanol une nuit à 4°C, centrifugation 15 mn à 4 000 g et resuspension

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dans 15 ml d'eau, le pH étant ajusté à 7 pour favoriser les réactions de branchement).

Après incubation une nuit à 30°C, le produit branché est précipité par 3 volumes d'éthanol durant 12h à 4°C puis
5 il est centrifugé à 10 000 g pendant 15 mn à 4°C.

Un spectre d'absorption entre 400 et 700 nm est réalisé à partir du produit branché qui est redissout dans 100 µl de soude 0,01 N puis 60 µl de cette solution est mélangé à 400 µl d'iode 1X (0,0025% de I₂ ; 0,25 % de IK).

10 La longueur d'onde du complexe amylopectine de maïs avec l'iode est de 530 nm, et celui du complexe amylopectine de maïs modifiée par le mélange d'enzymes de branchement d'amidon extraites d'algues avec l'iode est de 505 nm. La
15 différence de 25 nm traduit bien une modification significative de l'amylopectine et l'apparition de nouveaux branchements de cette structure.

La détermination des longueurs de chaînes résultantes du traitement de l'amylopectine par le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues a été
20 effectuée comme suit : 17,6 mg d'amylopectine sont incubés avec 17000 unités d'activités de branchement dans un volume de 21 ml, ajusté à pH 7,5. Après une incubation pendant 6 h. à 30°C, le produit branché est précipité par 3 volumes d'éthanol durant une nuit à 4°C puis il est centrifugé à
25 10000 g pendant 15 mn à 4°C.

17,6 mg d'amylopectine ainsi modifiée sont repris dans 1,1 ml d'eau et agités vigoureusement, puis on ajoute 0,17 ml de DMSO et porte le mélange à 100°C dans un tube à hydrolyse au bain-marie REACTI-THERM, avec agitation, sans
30 vide, pendant 6 min.

On place ensuite le tube à hydrolyse dans un autre bain-marie REACTI-THERM, avec agitation, à une température de 45°C, puis, après stabilisation à cette température, on

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ajoute 0,08 ml de tampon acétate de sodium 1N, amené à pH 3,5 avec de l'acide acétique. On ajoute 5 µl d'isoamylase à 59000 U/ml (enzyme isolée de *Pseudomonas amyloclavata* de HAYASHIBARA) et on incube à 45°C pendant 2h30. On arrête
5 ensuite la réaction en portant le milieu réactionnel à 100°C pendant 3 min.

On réalise en parallèle une opération identique sur 17,6 mg d'amylopectine non modifiée, ce qui constitue le témoin de la réaction.

10 Les résultats obtenus par chromatographie anionique avec détection ampérométrique (DIONEX) indiquent une majorité de chaînes de D.P. 6, D.P. 7 et D. P. 8, avec très peu de D.P. 1 à D.P. 5 pour l'amylopectine standard, tandis
15 que les résultats correspondant à l'amylopectine modifiée indiquent au contraire une majorité de chaînes de D.P. 1 à D.P. 5, ce qui traduit une redistribution des longueurs de chaînes glucosidiques.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires caractérisé par le fait que l'on :

5 a. modifie une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon,

 b. traite cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré,

10 c. effectue un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir ledit mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on conduit l'étape a en modifiant l'algue unicellulaire par une technique de mutation par insertion.

15 3. Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que l'on conduit l'étape b en effectuant une lyse de l'algue unicellulaire de manière mécanique, sonique, chimique ou enzymatique, de préférence de manière mécanique.

20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que l'on conduit l'étape c en effectuant un tamisage moléculaire par une technique de séparation chromatographique ou de séparation sur membrane d'ultrafiltration , de préférence par une technique de
25 séparation chromatographique sur gel filtration.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'algue unicellulaire est l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

30 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* est dépourvue d'activité débranchante de l'amidon par mutation par insertion au niveau du locus *sta7* .

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Composition enzymatique caractérisée en ce qu'elle contient un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon de type I et de type II extraites d'algues unicellulaires et en ce qu'elle est significativement, voire totalement appauvrie en enzymes à activités amylasique et débranchante de l'amidon

8. Procédé de modification de l'amidon et de ses dérivés, caractérisé par le fait que l'on fait agir sur l'amidon et/ou sur l'un au moins de ses dérivés un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires obtenu par la mise en oeuvre d'un procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou une composition enzymatique conforme à la revendication 7.

9. Amidons et dérivés d'amidon modifiés susceptibles d'être obtenus par la mise en oeuvre d'un procédé conforme à la revendication 7.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ABREGE DESCRIPTIF

L'invention concerne un procédé d'obtention d'un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires caractérisé par le fait que l'on modifie une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon, traite cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré, et effectue un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir ledit mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

THIS PAGE BLANK (USPTO)